

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 12 月 16 日 (16.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/108918 A1(51) 国際特許分類: C12N 11/00, C12M
1/40, G01N 27/30, 27/48, H01M 8/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007335

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 21 日 (21.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-161272 2003 年 6 月 5 日 (05.06.2003) JP
特願2003-313462 2003 年 9 月 5 日 (05.09.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ソニー株式会社 (SONY CORPORATION) [JP/JP]; 〒1410001 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 敦 (SATO, Atsushi) [JP/JP]; 〒1410001 東京都品川区北品川 6 丁

目 7 番 3 5 号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP). 池田 篤治 (IKEDA, Tokuji) [JP/JP]; 〒6060081 京都府京都市左京区上高野畑町 1 0 - 5 Kyoto (JP). 加納 健司 (KANO, Kenji) [JP/JP]; 〒6038116 京都府京都市北区紫竹上本町 4 0 - 1 Kyoto (JP).

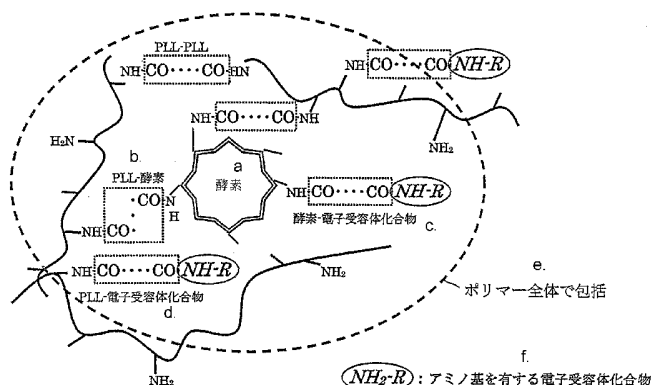
(74) 代理人: 森 幸一, 外 (MORI, Koh-ichi et al.); 〒1710022 東京都豊島区南池袋 2 丁目 49 番 7 号 池袋パークビル 7 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: IMMOBILIZATION SUPPORT, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, ELECTRODE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, ELECTRODE REACTION UTILIZING APPARATUS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 固定化担体およびその製造方法ならびに電極およびその製造方法ならびに電極反応利用装置およびその製造方法



a...ENZYME
b...PLL/ENZYME
c...ENZYME/ELECTRON ACCEPTOR COMPOUND
d...PLL/ELECTRON ACCEPTOR COMPOUND
e...ENCLOSED BY WHOLE POLYMER
f...AMINATED ELECTRON ACCEPTOR COMPOUND

(57) Abstract: Using an immobilization support comprising glutaraldehyde and poly-L-lysine having an electron acceptor compound added thereto, simultaneous immobilization of enzyme and electron acceptor compound on an electrode is carried out. For example, diaphorase is used as the enzyme, and 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ) is used as an aminated electron acceptor compound.

(57) 要約: グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとに加えて電子受容体化合物を含む固定化担体を用い、酵素および電子受容体化合物を電極に同時固定する。例えば、酵素としてジアホラーゼ、アミノ基を有する電子受容体化合物として2-アミノ-3-カルボキシ-1, 4-ナフトキノン (ACNQ) を用いる。



WO 2004/108918 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

固定化担体およびその製造方法ならびに電極およびその製造方法ならびに電極反応利用装置およびその製造方法

5

技術分野

この発明は、固定化担体およびその製造方法ならびに電極およびその製造方法ならびに電極反応利用装置およびその製造方法に関し、例えば、バイオセンサー、バイオリアクター、バイオ燃料電池など、生
10 体代謝を模倣し、電極反応に利用した各種の電極反応利用装置に適用して好適なものである。

背景技術

生物内で行われている生体代謝は基質選択性が高く、極めて高効率
15 な反応機構であり、室温・中性の比較的穏やかな雰囲気下で反応が進行する特徴を持つ。ここで言う生体代謝には、酸素や糖類・脂肪・タンパク質などの種々の栄養素を、微生物や細胞の成長に必要なエネルギーに変換する呼吸や光合成などが含まれる。

このような生体内反応には、タンパク質から成る生体触媒、すなわ
20 ち酵素が大きく関与している。この酵素の触媒作用を利用するという考え方は、人類の歴史とともに古くから実践されてきた。その応用範囲は、醸造業、発酵業、繊維工業、皮革工業、食品工業、医薬品工業など多種にわたり、近年では、その触媒機能を電極系に組み込んだバイ
25 オセンサー、バイオリアクター、バイオ燃料電池など、エレクトロニクス分野への応用も検討・実用化されてきている。

ところで、酵素はタンパク質から成り、一般に、熱、強酸、強アル

カリ、有機溶媒などに不安定であるため、酵素の使用は、専ら水溶媒中に制限されてきた。従来、酵素反応を行うには、酵素を水溶媒中に溶解させて基質に作用させるバッチ法 (batch process) が用いられているが、反応終了液中から酵素のみを変性させずに回収・再利用することは技術的に非常に困難であるため、一反応ごとに酵素を捨てることになり、不経済な使用方法であると言える。

このような背景から、水に不溶な固定化酵素の提案がなされている。これによれば、水に不溶化させることで、特異性の高い酵素を一般の化学反応に用いられているような固体触媒と同様に取り扱うことができ、酵素の利用方法として非常に有用である。

酵素を電極系に応用する場合にも同様なことが言え、電極上に酵素を高密度で固定化することにより、電極近傍で起こっている酵素反応現象を効率良く電気信号として捉えることが可能となる。ちなみに、電極系を検討する場合、タンパク質である酵素と電極との間では、一般的に、電子媒介が起こり難く、電子伝達媒体となる電子受容体化合物が必要となるが、この電子受容体化合物も酵素と同様に固定化されるのが望ましい。

酵素の固定化法は大きく分けると包括法と結合法との2種に分類される。包括法は、格子型とマイクロカプセル型とに細分される。一方、結合法は、その結合様式により吸着法および共有結合法（架橋法）などに細分される。

包括法は、酵素自身とは結合反応を起こすことなく、水不溶性の半透膜性の高分子物質によって酵素を包み込む方法であり、そのメリットは比較的温和な条件にて固定化されるため、酵素活性を損なう心配が低い点が挙げられる。反面、固定化した際に酵素は溶出せず、一方で、酵素の反応基質は透過しやすい空孔を有する必要があるため、酵

素－基質の組み合わせが替わるごとに適当な包括剤の選択が求められる。

吸着法は、酵素のイオン吸着あるいは物理吸着を利用するもので、固定化の方法が容易な反面、使用条件により吸着状態が影響を受けやすく、酵素の吸着および脱離が不安定になりやすいため、一般的な固定化法とは言い難い。

共有結合法は、架橋試薬を用いて酵素のアミノ基、カルボキシ基などを結合に用いる方法で、酵素が比較的容易な方法で安定に固定化される反面、架橋試薬が酵素の活性中心付近を修飾したり、架橋される条件が酵素にとって厳しいものだったりする場合があります、酵素活性が失活することが少なくない。

なお、多孔体電極の内部に導電性高分子を生成するモノマーと支持電解質とを含有させた溶液を含浸させ、これを支持電解質溶液の中で電解酸化させることにより、多孔体電極内全表面に導電性高分子被膜を形成する機能電極の製造方法が提案されている（特開平 6－271655 号公報）。また、酵素反応を利用した、D－乳酸と L－乳酸などの光学異性体の測定方法が提案されている（特開平 6－121697 号公報）。

以上のように、上述の従来の各固定化法は、いずれもデメリットが存在するため、酵素－基質の組み合わせごとに最適な固定化法を検討する必要があった。さらに、電極系への固定化を検討する場合には、先に述べたように電子伝達媒体となる電子受容体化合物の固定化も望ましく、酵素－電子受容体化合物－基質それぞれの能力を生かす固定化が必要とされ、より困難を極める。

したがって、この発明が解決しようとする課題は、酵素を電極系に固定化しあるいは、酵素および電子受容体化合物を同時に固定化し、

酵素の触媒機能を電極系に組み込んだ、高効率な機能性電極を実現するのに好適な固定化担体、これを用いた電極およびこの電極を用いた電極利用反応装置ならびにそれらの製造方法を提供することにある。

5 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、架橋剤にグルタルアルデヒドとポリーLーリシンとを用いた固定化担体の使用が有効であることを見出した。望ましくは、これらの架橋剤に加えて電子受容体化合物、特にアミノ基を有する電子受容体化合物を
10 組み合わせることが有効である。さらに検討を行った結果、一般的には、架橋剤に、アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物（上記のグルタルアルデヒドはその一例）とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物（上記のポリーLーリシンはその一例）とを含む固定化担体、ある
15 いは、カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含む固定化担体の使用が有効であるという結論に至った。

この発明は、上記の検討に基づいて案出されたものである。

すなわち、上記課題を解決するために、この発明の第1の発明は、
20 グルタルアルデヒドとポリーLーリシンとを含むことを特徴とする固定化担体である。

この発明の第2の発明は、

グルタルアルデヒドとポリーLーリシンとが架橋した構造を有することを特徴とする固定化担体である。

25 グルタルアルデヒド（グルタルジアルデヒド）は2つのアルデヒド基を有し、シッフ塩基を形成するものであり、架橋法に用いられる試

- 薬として応用されてきている。しかしながら、グルタルアルデヒド単体を用いた実際の酵素固定化ではその酵素固定化量に限界があり、また、酵素の膜外溶出も完全には抑制されていない。一方、ポリ-L-リシン（ポリペプチド）を構成するL-リシンは α -アミノ酸の一種
- 5 で、殆んど全てのタンパク質の構成アミノ酸として存在しており、側鎖に一級アミノ基を有するために豊富な陽電荷を持ち、酵素に対する毒性もない。また、ポリ-L-リシンはその豊富な陽電荷から、陰電荷を持つ酵素との静電作用的なポリイオンコンプレックス法の固定化担体として用いられることもあるが、周囲の電荷バランスの影響を受けやすく、使用条件によって酵素固定化量や安定性が大きく変化する。
- 10 また、これらの固定化法・材料を用いた酵素・電子受容体化合物の同時固定化の実施例は少なく、酵素・電子受容体化合物の固定化量と活性保持とを両立させ、しかも、酵素固定化電極が反応全体の律速とならない高効率な機能性電極の報告例はなかった。
- 15 これに対し、第1および第2の発明においては、上記のようにグルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとの組み合わせから成る固定化担体を用いることで、それぞれが持つ酵素固定化能力を大きく改善することが可能となり、固定化担体全体として優れた酵素固定化能力を得ることができる。
- 20 グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとの組成比は、固定化する酵素と、それに対応する基質とに応じて最適な値が異なるが、一般的には任意の組成比で構わない。
- 25 第1および第2の発明において、固定化担体は、好適にはさらに、電子受容体化合物を含む。この電子受容体化合物は、基本的には、固定化担体を電極に形成した場合に、電極と比較的容易に電子の授受を行うことができるものであればいかなるものでも良いが、アミノ基を

有していれば、なお好ましい。グルタルアルデヒドおよびポリーLーリシンから成る架橋剤にこの電子受容体化合物を組み合わせることで、電子受容体化合物の固定化と同時に、グルタルアルデヒドとポリーLーリシンとの架橋を支持する役目も果たすことが可能である。

- 5 固定化担体には、必要に応じて、上記の電子受容体化合物以外の化合物を含ませても良い。

 この発明の第3の発明は、

- アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含むことを特徴とする固定化担体である。
- 10

 この発明の第4の発明は、

- アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とする固定化担体である。
- 15

 この発明の第5の発明は、

- カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含むことを特徴とする固定化担体である。
- 20

 この発明の第6の発明は、

- カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とする固定化担体である。

 この発明の第7の発明は、

- 25 グルタルアルデヒドとポリーLーリシンとを含む固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極である。

この発明の第 8 の発明は、

アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 1 の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第 2 の化合物とを含む固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極である。

この発明の第 9 の発明は、

アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 1 の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第 2 の化合物とが架橋した構造を有する固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極である。

この発明の第 10 の発明は、

カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 3 の化合物とカルボキシ基を有する第 4 の化合物とを含む固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極である。

この発明の第 11 の発明は、

カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 3 の化合物とカルボキシ基を有する第 4 の化合物とが架橋した構造を有する固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極である。

この発明の第 12 の発明は、

固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、固定化担体が、アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 1 の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第 2 の化合物とを含むことを特徴とするものである。

この発明の第 13 の発明は、

固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、

固定化担体が、アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とするものである。

5 この発明の第14の発明は、

固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、
固定化担体が、カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含むことを特徴とするものである。

10 この発明の第15の発明は、

固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、
固定化担体が、カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とするものである。

15 この発明の第16の発明は、

アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを重合反応させるようにしたことを特徴とする固定化担体の製造方法である。

20 この発明の第17の発明は、

カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを重合反応させるようにしたことを特徴とする固定化担体の製造方法である。

25 この発明の第18の発明は、

アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる

る基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法である。

この発明の第19の発明は、

- 5 カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法である。

この発明の第20の発明は、

- 10 アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法である。

この発明の第21の発明は、

- 15 カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法である。

この発明の第22の発明は、

- 20 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

- 25 アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化することにより電極を製造する工程を有することを特徴とするものである。

この発明の第23の発明は、

固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化することにより電極を製造する工程を有することを特徴とするものである。

この発明の第24の発明は、

固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

10 アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化することにより電極を製造する工程を有することを特徴とするものである。

この発明の第25の発明は、

15 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

20 ガルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化することにより電極を製造する工程を有することを特徴とするものである。

第3～第25の発明において、第1の化合物と第2の化合物との組成比あるいは第3の化合物と第4の化合物との組成比は、使用する化合物の種類と、固定化する酵素と、それに対応する基質とに応じて最適な値が異なるが、一般的には任意の組成比で構わない。固定化担体が好適にはさらに電子受容体化合物を含むこと、必要に応じて電子受容体化合物以外の化合物を含ませて良いことは、第1および第2の発

明と同様である。

架橋剤（架橋試薬）として用いられる第1～第4の化合物の具体例を挙げると、次のとおりである。ただし、以下の架橋剤の例において、RまたはR'は、脂肪族炭化水素、脂環式炭化水素、芳香族炭化水素、
5 α , β , γ -シクロデキストリンなどのシクロデキストリン、クラウンエーテル、カリックスアレン、ペプチド、酵素、発色色素などから成る群より選ばれる少なくとも1種である。また、RおよびR'は互いに異なっている場合でも同一でも構わない。

まず、酵素のNH₂基、あるいは固定化担体にNH₂基を有する電子受容体化合物も含ませる場合にはそのNH₂基と架橋することができるものとして、例えば、以下に例示する架橋剤の中から選ばれる1
10 種または2種以上を用いることができる。グルタルアルデヒドはアルデヒド（R-CHO）の1種である。

- ・カルボン酸（R-COOH）
- 15 ・過酸（R-CO(OOH)）
- ・チオカルボン酸（R-CSOH）
- ・イソシアン化合物（R-NC）
- ・シアン酸エステル（R-OCN）
- ・イソシアン酸エステル（R-NOC）
- 20 ・チオシアン酸エステル（R-SCN）
- ・アルデヒド（R-CHO）
- ・チオアルデヒド（R-CHS）
- ・ケトン（R-CO-R'）
- ・チオケトン（R-CS-R'）
- 25 ・チオール（R-SH）
- ・イミン（R=NH）

・過酸化物 ($R-OOR'$)

次に、酵素の $COOH$ 基、あるいは固定化担体に $COOH$ 基を有する電子受容体化合物も含ませる場合にはその $COOH$ 基と架橋することができるものとして、例えば、以下に例示する架橋剤の中から選ばれる 1 種または 2 種以上を用いることができる。

- ・アミン ($R-NH_2$, $RR'NH$)
- ・過酸 ($R-CO(OOH)$)
- ・チオカルボン酸 ($R-CSOH$)
- ・エステル ($R-COOR'$)
- 10 ・ハロゲン化合物 ($R-X$, X : ハロゲン原子)
- ・酸ハロゲン化物 ($R-COX$, X : ハロゲン原子)
- ・アミド ($R-CONH_2$)
- ・ヒドラジド ($R-CO-NHNH_2$)
- ・イミド ($R-CO-NH-OC-R'$)
- 15 ・アミジン ($R-CNHNH_2$)
- ・ニトリル ($R-CN$)
- ・イミン ($R=NH$) (ポリエチレンイミンなど)

なお、デンドリマー (例えば、ポリアミドアミンやポリプロピレンイミンなど) を用いることも可能である。

- 20 この発明による酵素の固定化法はいかなる酵素にも適用することができ、酵素タンパク質中の官能基にアミノ基を有するものであればなお好ましいが、アミノ基を有していなくとも構わない。また、酵素は 1 種でも良いし、2 種類以上のものを組み合わせても良く、後述の補酵素が必要な 1 種または 2 種類以上の酵素と補酵素が必要でない 1 種
- 25 または 2 種類以上の酵素とを組合せても良い。酵素の具体例を挙げると、 $NADH$ (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) / N

NAD^+ （ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）の酸化還元酵素として知られるジアホラーゼや、グルコースデヒドロゲナーゼ（ NAD 依存型酵素）などである。

ここで、酵素の分類（IUBMB：国際生化学分子生物学連合／酵素命名委員会）について説明する。

酵素は酵素番号（EC番号）によって分類されており、次の6種類（EC1～EC6）に大別される。

EC1；オキシドレダクターゼ（oxidoreductase）（酸化還元酵素）

・酸化還元に関与する酵素は全てここに分類され、酵素表の約26％を占める。

〔例〕 alcohol dehydrogenase [EC1.1.1.1]

diaphorase [EC1.6.99.-]（後述の発明の実施例で用いるジアホラーゼもここに分類される）

以降、第2、第3の数字で細分化される。第4の数字は委員会に公認されてから与えられる番号である。

上記例の場合、[EC1.1.--]（酸化還元酵素のうち）供与体の $\text{C}-\text{OH}$ 基に作用するもの

[EC1.6.--]： NADH あるいは NADPH に作用するもの

20 EC2；トランスフェラーゼ（transferase）（転移酵素）

・1つの化合物（供与体）のある官能基を他の化合物（受容体）に移す反応を触媒する。

〔例〕 aspartate carbamoyltransferase [EC2.1.3.2]

hexokinase [EC2.7.1.1]

25 EC3；ヒドロラーゼ（hydrolase）（加水分解酵素）

・基質の加水分解を触媒する。

[例] β -amylase [E C 3.2.1.2]

pepsin A [E C 3.4.23.1]

E C 4 ; リアーゼ (lyase)

- ・ C - C 結合、C - O 結合、C - N 結合などから脱離反応により二
5 重結合を残す反応やその逆反応を触媒する酵素がここに分類される。

[例] oxaloacetate decarboxylase [E C 4.1.1.3]

fumarate hydratase [E C 4.2.1.2]

E C 5 ; イソメラーゼ (isomerase) (異性化酵素)

- ・ 異性化反応を触媒する。

10 [例] alanine racemase [E C 5.1.1.1]

triose-phosphate isomerase [E C 5.3.1.1]

E C 6 ; リガーゼ (ligase) (合成酵素)

- ・ 合成反応を触媒する。

[例] tyrosine-tRNA ligase [E C 6.1.1.1]

15 acetate-CoA ligase [E C 6.2.1.1]

また、酵素が働くためには酵素と基質のほかに、補酵素と呼ばれる、
酵素と結合して反応に不可欠な働きをする低分子の有機化合物を必要
とする場合があり、この補酵素も酵素や電子受容体化合物と同様に固
定化されるのが望ましい。NADHやNAD⁺、あるいはNADPH
20 (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸)やNADP
(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸)はこの補酵素の例
である。

電極の材料は、導電性を有し、かつ水に不溶の物質であればいかな
る物質でも良く、これらの物質を単独で用いても、これらの物質を他
25 の物質と組み合わせても良い。カーボンフェルト、活性炭などの高表
面積を有する材料を電極材料に使用すれば、単位体積あたりに固定化

される酵素・電子受容体化合物量の増大も期待することができる。

電極反応利用装置としては、具体的には、例えば、生体代謝を模倣した、バイオセンサー、バイオリアクター、バイオ燃料電池などが挙げられる。

- 5 上述のように構成されたこの発明によれば、固定化担体に含まれる第1の化合物と第2の化合物とが架橋し、あるいは、第3の化合物と第4の化合物とが架橋することにより、具体的には例えば、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとが架橋することにより、十分に長く、
- 10 しかも3次元的にほぼ自由な構造をとることができるポリマーが形成される。そして、電極に酵素を固定化する場合にこの固定化担体を用いることにより、このポリマーにより酵素を良好な形態で包括することができる。さらに、固定化担体に電子受容体化合物も含ませることにより、酵素と電極との間の電子伝達も容易にすることができる。

15 図面の簡単な説明

- 第1図は、この発明の一実施形態において固定化担体による酵素および電子受容体化合物の電極上への同時固定化のイメージを示す略線図、第2図は、NADHを電気化学的に酸化させた時の反応機構モデルを示す略線図、第3図は、NADHを電気化学的に酸化させた時の、
- 20 直接酸化波を表すサイクリックボルタモグラムを示す略線図、第4図は、ジアホラーゼおよびACNQを用いてNADHを電気化学的に酸化させた時の反応機構モデルを示す略線図、第5図Aおよび第5図Bは、触媒電流における、シグモイド型およびピーク型を表すサイクリックボルタモグラムを示す略線図、第6図Aおよび第6図Bは、VK
- 25 3およびACNQの構造を示す略線図、第7図は、実施例4において得られたサイクリックボルタモグラムを示す略線図、第8図は、この

発明の一実施形態による酵素固定化電極を利用した酵素型燃料電池を示す略線図、第 9 図は、第 8 図に示す酵素型燃料電池に用いられる酵素固定化電極の一部を拡大して示す略線図、第 10 図は、この発明の一実施形態による酵素固定化電極を利用したバイオリアクターを示す略線図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、この発明の一実施形態について図面を参照しながら説明する。

この一実施形態においては、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシン
10 ンとに加えて、電子受容体化合物を含む固定化担体を用い、酵素および電子受容体化合物、あるいは、酵素、補酵素および電子受容体化合物を電極に同時固定化する。ここで、電子受容体化合物としては、アミノ基を有するものであってもそうでなくても良い。

固定化担体による酵素および電子受容体化合物の電極上への同時固定化のイメージを第 1 図に示す。ただし、固定化担体は、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとに加えて、アミノ基を有する電子受容体化合物を含み、また、酵素はアミノ基を有するものとする。第 1 図
15 中、PLL はポリ-L-リシン、 $\text{NH}_2\text{-R}$ はアミノ基を有する電子受容体化合物を示す。第 1 図に示すように、グルタルアルデヒドの両端の 2 つのアルデヒド基とポリ-L-リシンのアミノ基とがアミド結合を形成して架橋することで十分に長く、しかも 3 次元的にほぼ自由な構造をとることができるポリマーが形成されており、このポリマー全体でアミノ基を有する酵素が包括されている（破線で描かれた楕円は包括のイメージを示す）。これに加えて、この場合、酵素および電
20 子受容体化合物ともアミノ基を有するため、グルタルアルデヒドの一端のアルデヒド基とポリ-L-リシンのアミノ基とがアミド結合を形

成すると同時にグルタルアルデヒドの他端のアルデヒド基と酵素のアミノ基とがアミド結合を形成して架橋したり、グルタルアルデヒドの一端のアルデヒド基とポリ-L-リシンのアミノ基とがアミド結合を形成すると同時にグルタルアルデヒドの他端のアルデヒド基と電子受容体化合物のアミノ基とがアミド結合を形成して架橋したり、グルタルアルデヒドの一端のアルデヒド基と酵素のアミノ基とがアミド結合を形成すると同時にグルタルアルデヒドの他端のアルデヒド基と電子受容体化合物のアミノ基とがアミド結合を形成して架橋したりすることが可能である。第1図に示す構造体はポリイオンコンプレックスの一例である。

次に、実施例について説明する。

実施例 1

まず、酵素としてジアホラーゼ、アミノ基を有する電子受容体化合物として2-アミノ-3-カルボキシー-1,4-ナフトキノン(ACNQ)を固定化した機能性電極のNADH酸化能を評価する。ジアホラーゼを用いない反応系の場合、第2図に示すように、NADHは電極上で直接酸化されて NAD^+ となり電子(e^-)を電極に放出し、第3図に示すように、サイクリックボルタモグラム(CV)上では0.7V付近にピークとして現れる。このように、NADHを電極上で直接酸化する場合には大きな過電圧が必要であることが分かる。そのため、酵素固定化電極には、この過電圧を低減させ、かつ効率良くNADHを酸化させる機能が求められる。第4図はジアホラーゼ(DI)、ACNQを介したNADH酸化反応機構であり、NADHがジアホラーゼ-ACNQを介して酸化され、CV上ではACNQの酸化還元電位である-0.3V付近に触媒電流としてその状態が観測され、NADHの酸化過電圧が低減される。以下、実際の実験条件を示す。

容量 1 ml のポリテトラフルオロエチレン製電解セルを反応槽として、電圧を印加することにより NADH の電気化学的酸化反応を行った。反応槽に水性緩衝溶液としてリン酸緩衝溶液 pH 8.0 – 1 ml を注入し、15 分間の窒素ガス置換を行い、充分量にあたる NADH

5 リン酸緩衝溶液 (10 mM) を添加した。この反応溶液中に対極として白金線を浸漬し、参照電極には銀 (Ag) / 塩化銀 (AgCl) 電極を用いた。次に、グラッシーカーボン電極 (BAS, $\phi = 3.0$ mm) 上に、ジアホラーゼ (ユニチカ, from *Bacillus stearothermophilus*) リン酸緩衝溶液 (47 μ M) を 2 μ l、ACNQ エタノール溶液 (10 mM) を 2.8 μ l、グルタルアルデヒド水溶液 (0.125%) を 3 μ l、ポリ-L-リシン水溶液 (1%) を 3 μ l 滴下し、

10 良く混合させて室温にて風乾の後、蒸留水で水洗し、ジアホラーゼ / ACNQ 固定化電極とした。また、比較のために、ジアホラーゼと ACNQ 滴下量 (各 2 μ l、2.8 μ l) はそのままに、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンの滴下量を、合計滴下量 6 μ l のまま、それぞれ 2 μ l と 4 μ l、および 4 μ l と 2 μ l に組成を変化させたもの、さらにはグルタルアルデヒドおよびポリ-L-リシンのみをそれぞれ単独で 6 μ l 用いたものを同様の方法にて作製し、それぞれ固定化電極を用意した。ジアホラーゼ / ACNQ 固定化部位をリン酸緩衝

15 溶液中に浸漬した。これらの対極、参照電極およびジアホラーゼ / ACNQ 固定化電極をポテンシオスタットに接続し、電位走査法 (サイクリックボルタンメトリー、CV) にて電位掃引を行い、電気化学的に反応を観察した。電位の掃引範囲は -0.5 ~ 0.1 V とし、この範囲で観測される最大触媒電流値を表 1 に示した。なお、実験に用いた酵素、試薬、装置あるいは実験雰囲気は実験を通して同一条件であり、作製した酵素固定化部位の固定化量・安定性・膜特性などの優劣

20

25

が最大触媒電流の差として現れている。また、このときのC V上での曲線形状も併せて示した。グルタルアルデヒドとポリーLーリシンとを組み合わせたものは、それぞれ単独で同量を用いたものと比較して優位性が確認できる（表1－(1), (2) vs. (4), (5)）。また、C V上での曲線形状については、第5図A（シグモイド型（表1－(6)）および第5図B（ピーク型（表1－(1)）においてその具体例を示す。シグモイド型の触媒電流は、すなわち電極性能の限界（電極性能律速）を示唆する電流であり、0.7 V付近に直接酸化波が表れることから十分にNADHが残っていることを表しているのに対し、グルタルアルデヒドとポリーLーリシンとを組み合わせたものに見られるピーク型のものは、基質であるNADHの供給律速を示すもので、0.7 V付近のNADHの直接酸化波が観測されないことから、電極近傍のNADHが全て酵素反応に消費され、電極性能が勝っていることが示唆され、更なる電流値上昇が期待できる高機能電極であることが分かる。

表1

	固定化条件			最大触媒電流値(μ l)	CV形状
	架橋試薬	添加量(μ l)	酵素・電子伝導媒体		
(1)	GA + PLL	3 + 3	DI, ACNQ	67.5	ピーク
(2)	GA + PLL	2 + 4	DI, ACNQ	58.9	ピーク
(3)	GA + PLL	4 + 2	DI, ACNQ	10.7	シグモイド
(4)	GA	6	DI, ACNQ	24.9	シグモイド
(5)	PLL	6	DI, ACNQ	7.49	シグモイド
(6)	GA + PLL	3 + 3	DI	13.1	シグモイド
(7)	溶存系	—	DI, ACNQ	0.663	シグモイド
(8)	GA + PLL	3 + 3	DI, VK3	26.4	シグモイド
(9)	GA	6	DI, VK3	18.1	シグモイド
(10)	PLL	6	DI, VK3	6.82	シグモイド

※ 表中の略語 GA:グルタルアルデヒド、PLL:ポリーLーリシン、DI:ジアホラーゼ

実施例 2

上記実施例 1 と同様の測定装置を用い、酵素固定化電極の条件を変えて同一の実験を行った。実施例 1 の固定化電極作製方法に対し、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンの滴下量（各 $3 \mu\text{l}$ ）はそのままに、ジアホラーゼのみを $2 \mu\text{l}$ 滴下・固定化したジアホラーゼ固定化電極を準備した。このときの最大触媒電流値を表 1 に示した。ジアホラーゼ・ACNQ とともに電極上に固定化せず、リン酸緩衝溶液中に溶解させた場合（無固定状態）と比べて、ジアホラーゼ固定化電極は得られる触媒電流の面で優位であり（表 1 - (6) vs. (7)）、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンの組み合わせにより酵素だけの固定化も可能であることが分かるが、実施例 1 の結果と比較すると、アミノ基を有する ACNQ を同時固定化させた方が電極性能として好ましいことが分かる（表 1 - (1) vs. (6)）。

実施例 3

上記実施例 1 の固定化電極作製方法に対し、電子受容体化合物に 2-メチル-3-カルボキシー-1,4-ナフトキノン（ビタミン K₃、VK₃）を用い、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンを組み合わせた（各 $3 \mu\text{l}$ ）もの、さらに、グルタルアルデヒドおよびポリ-L-リシンのみをそれぞれ単独で $6 \mu\text{l}$ 用いた VK₃ 固定化電極を作製し、同一条件下において同様の測定を行った。なお、VK₃ の滴下濃度は ACNQ の場合と同量とした。第 6 図 A に VK₃ の構造を示すが、アミノ基が存在しない以外は第 6 図 B に示す ACNQ と構造が類似しており、電気化学的特性も同じような傾向を示す。このときの最大触媒電流値を表 1 に示した。グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンの組み合わせは、それぞれを単独で用いた場合よりも優位であることがアミノ基を有しない VK₃ においても示唆された（表 1 - (8)

vs. (9), (10))。しかしながら、実施例 1 の結果からも、電子受容体化合物に A C N Q を用いた場合のほうが優位であり、アミノ基を有する電子受容体化合物を同時固定化させた方が電極性能として優位であることが分かる (表 1 - (1) vs. (8))。なお、酵素をグルコースオキシダーゼにした場合においても、同様の傾向があることを確認済みである。

以上の実施例 1 ~ 3 から、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンの組み合わせからなる固定化担体は有用で、いかなる酵素、いかなる電子受容体化合物受容体にも適用可能であることが分かるが、好ましくは、電子受容体化合物にはアミノ基を有するものを用いた方が電極性能、固定化部位安定化において優位である。

実施例 4

実施例 1 の酵素固定化電極においては、酵素としてジアホラーゼおよび電子受容体化合物として A C N Q が同時固定化されているが、この実施例 4 においては、これらに加えてさらに、酵素としてグルコースデヒドロゲナーゼおよびその補酵素である N A D H (N A D⁺) も同時固定化した。グルコースデヒドロゲナーゼの固定化により、グルコース (ブドウ糖) から電流を取り出すことができることが確認された。この場合、グルコース → グルコースデヒドロゲナーゼ → N A D H (N A D⁺) → ジアホラーゼ → 電子受容体化合物 → 電極の順で電子が伝播する。N A D H から下流は実施例 1 と同様である。この場合に得られたサイクリックボルタモグラムの第 7 図に示す。

次に、この一実施形態による酵素固定化電極の電極反応利用装置への適用例について説明する。

第 8 図はこの酵素固定化電極を利用したバイオ燃料電池 (Bio Fuel Cell) である酵素型燃料電池を示す。

第 8 図に示すように、この酵素型燃料電池においては、反応槽 1 1
内が仕切り 1 2 により二つに分けられており、それぞれに反応溶液 1
3 が入れられている。そして、仕切り 1 2 により仕切られた一方の側
の反応溶液 1 3 中にバイオカソード 1 4（負極）が浸漬され、他方の
5 側の反応溶液 1 3 中にバイオアノード 1 5（正極）が浸漬されている。
バイオカソード 1 4 とバイオアノード 1 5 との間には配線 1 6 を介し
て負荷抵抗 1 7 が接続される。

バイオカソード 1 4 およびバイオアノード 1 5 としてはこの一実施
形態による酵素固定化電極が用いられ、例えば第 9 図に示すような構
10 造を有する。第 9 図に示すように、これらのバイオカソード 1 4 およ
びバイオアノード 1 5 は、電極基板 1 8 上に酵素／電子受容体化合物
固定化層 1 9 が形成されたものである。第 9 図中、E n z y は酵素を
表し、M e d は電子受容体化合物を表す。

この酵素型燃料電池においては、バイオカソード 1 4 に例えば N A
15 D H を燃料として送り込むとともに、バイオアノード 1 5 には酸化剤
として例えば酸素などを送り込むことにより発電を行う。この場合、
バイオカソード 1 4 においては、酵素／電子受容体化合物固定化層 1
9 の酵素および電子受容体化合物により、実施例 1 で説明した原理で
N A D H から供給された電子（ e^{-} ）が電極基板 1 8 に受け渡され、
20 この電子が配線 1 6 を通ってバイオアノード 1 5 に移動し、発電が行
われる。

第 1 0 図はこの酵素固定化電極を利用したバイオリアクターを示す。

第 1 0 図に示すように、このバイオリアクターにおいては、反応槽
2 0 内に反応溶液 2 1 が入れられており、その中にワーキング電極 2
25 2、参照電極 2 3 および対向電極 2 4 が浸漬されている。ワーキング
電極 2 2 としてはこの一実施形態による酵素固定化電極が用いられ、

例えば第 9 図に示すような構造を有する。参照電極 2 3 と対向電極 2 4 との間には定電圧発生装置 2 5 が接続され、参照電極 2 3 が一定電位に保持されるようになっている。ワーキング電極 2 2 は、定電圧発生装置 2 5 の参照電極 2 3 が接続された端子に接続されている。

- 5 このバイオリアクターにおいては、基質（例えば、N A D H）をワーキング電極 2 2 に送り込み、酵素反応を起こさせて所望の生成物を生成する。

- 10 以上のように、この一実施形態によれば、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとに加えて、電子受容体化合物を含む固定化担体を用い、酵素および電子受容体化合物を電極に同時固定化して酵素固定化電極を構成しているので、従来の固定化担体、例えばグルタルアルデヒド単体やポリ-L-リシン単体を用いて酵素および電子受容体化合物を電極に同時固定化する場合と比べて、酵素固定化量を増加させることができ、酵素の溶出もほぼ完全に抑制することができ、周囲の電
- 15 荷バランスの影響を受けにくく、使用条件による酵素固定化量や安定性の変化も少なく、酵素の活性も保持することができ、しかも酵素固定化電極が反応全体の律速とならない高効率な機能性電極を得ることができる。そして、この酵素固定化電極を利用することにより、高性能の電極反応利用装置、例えばバイオ燃料電池、バイオリアクター、
- 20 バイオセンサーなどを実現することが可能となる。

以上、この発明の一実施形態および実施例について具体的に説明したが、この発明は、上述の実施形態および実施例に限定されるものではなく、この発明の技術的思想に基づく各種の変形が可能である。

- 25 例えば、上述の一実施形態および実施例において挙げた数値、構造、材料、プロセスなどはあくまでも例に過ぎず、必要に応じてこれらと異なる数値、構造、材料、プロセスなどを用いても良い。

- この発明によれば、固定化担体による電極への酵素の固定化あるいは酵素および電子受容体化合物の同時固定化と高密度固定化とが可能となり、基質供給律速を実現する高効率な機能性電極の実現が可能となる。また、測定系にあたる電極性能律速がなくなることにより、
- 5 バイオセンサー、バイオリアクター、バイオ燃料電池などにおける反応系の詳細な検討が可能となり、各バイオデバイスの発展に大きく貢献することが可能となる。また、この発明は電極系以外への酵素の固定化にも応用可能である。

請 求 の 範 囲

1. グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとを含むことを特徴とする固定化担体。
- 5 2. 電子受容体化合物をさらに含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載の固定化担体。
3. 上記電子受容体化合物はアミノ基を有することを特徴とする請求の範囲第2項記載の固定化担体。
4. グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとが架橋した構造を有する
- 10 5. アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含むことを特徴とする固定化担体。
6. アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とする固定化担体。
- 15 7. カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含むことを特徴とする固定化担体。
- 20 8. カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とする固定化担体。
9. グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとを含む固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極。
- 25 10. 補酵素をさらに含むことを特徴とする請求の範囲第9項記載の

電極。

1 1 ． アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含む固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極。

1 2 ． アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とが架橋した構造を有する固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極。

10 1 3 ． カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含む固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極。

1 4 ． カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とが架橋した構造を有する固定化担体と酵素とを含むことを特徴とする電極。

1 5 ． 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、

20 上記固定化担体が、アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含むことを特徴とする電極反応利用装置。

1 6 ． 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、

25 上記固定化担体が、アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基ま

たはイミノ基を有する第 2 の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とする電極反応利用装置。

17. 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、

- 5 上記固定化担体が、カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 3 の化合物とカルボキシ基を有する第 4 の化合物とを含むことを特徴とする電極反応利用装置。

18. 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置において、

- 10 上記固定化担体が、カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 3 の化合物とカルボキシ基を有する第 4 の化合物とが架橋した構造を有することを特徴とする電極反応利用装置。

- 15 19. アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 1 の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第 2 の化合物とを重合反応させるようにしたことを特徴とする固定化担体の製造方法。

- 20 20. カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 3 の化合物とカルボキシ基を有する第 4 の化合物とを重合反応させるようにしたことを特徴とする固定化担体の製造方法。

21. アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 1 の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第 2 の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法。

- 25 22. カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を 2 つ以上有する第 3 の化合物とカルボキシ基を有する第 4 の化合物と

を含む固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法。

23. アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を
5 有する第2の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法。

24. カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物と
10 を重合反応させた固定化担体に酵素を固定化するようにしたことを特徴とする電極の製造方法。

25. 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化することにより上
15 記電極を製造する工程を有することを特徴とする電極反応利用装置の製造方法。

26. 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

20 カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを含む固定化担体に酵素を固定化することにより上記電極を製造する工程を有することを特徴とする電極反応利用装置の製造方法。

27. 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、
25

アミノ基またはイミノ基を有する化合物と重合反応することができる

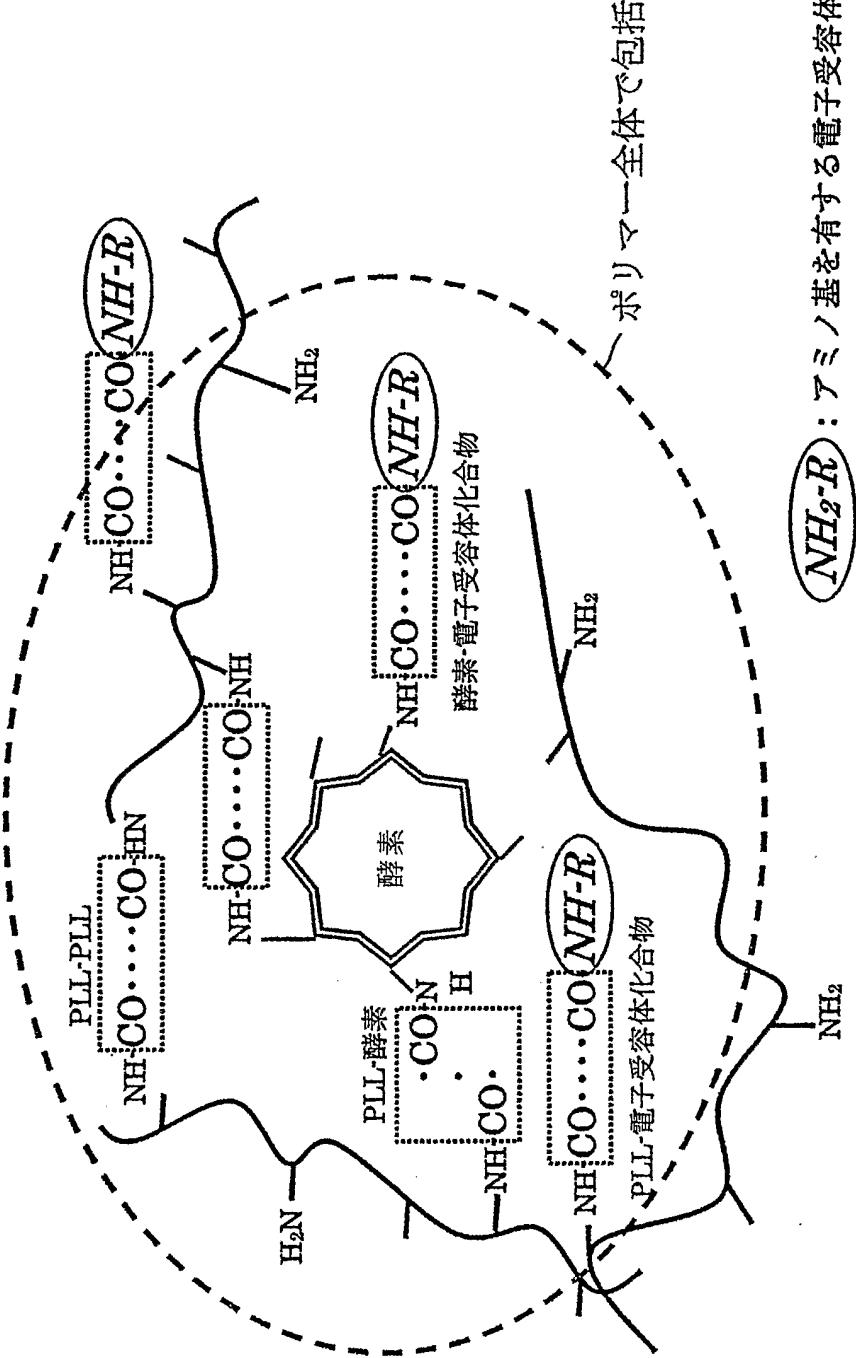
る基を2つ以上有する第1の化合物とアミノ基またはイミノ基を有する第2の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化することにより上記電極を製造する工程を有することを特徴とする電極反応利用装置の製造方法。

- 5 28. 固定化担体と酵素とを含む電極を用いた電極反応利用装置の製造方法において、

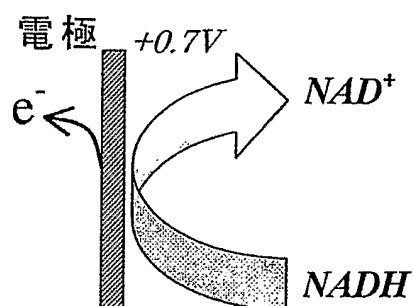
カルボキシ基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する第3の化合物とカルボキシ基を有する第4の化合物とを重合反応させた固定化担体に酵素を固定化することにより上記電極を製造する工程を有することを特徴とする電極反応利用装置の製造方法。

10

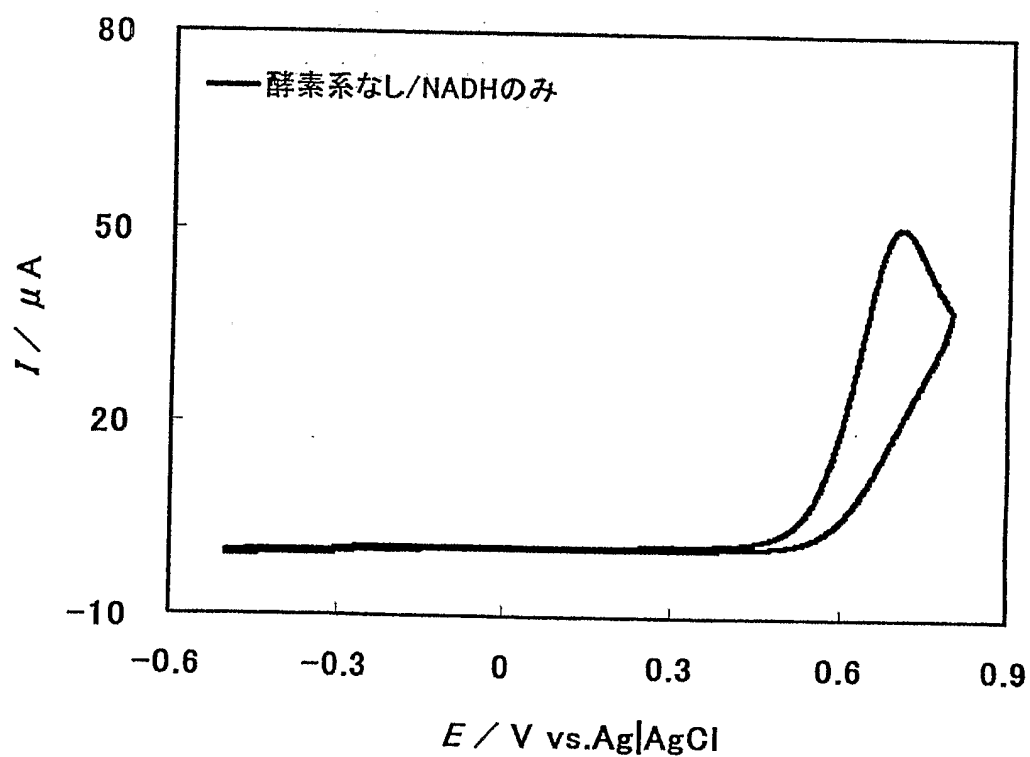
第1図



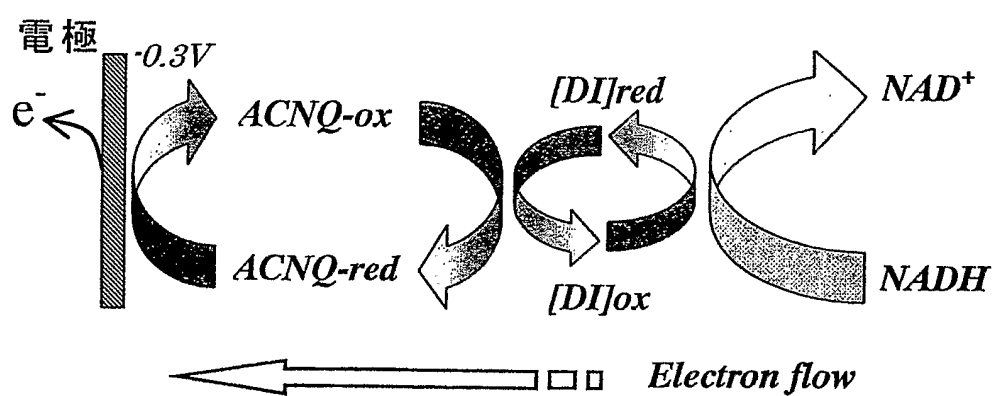
第2図



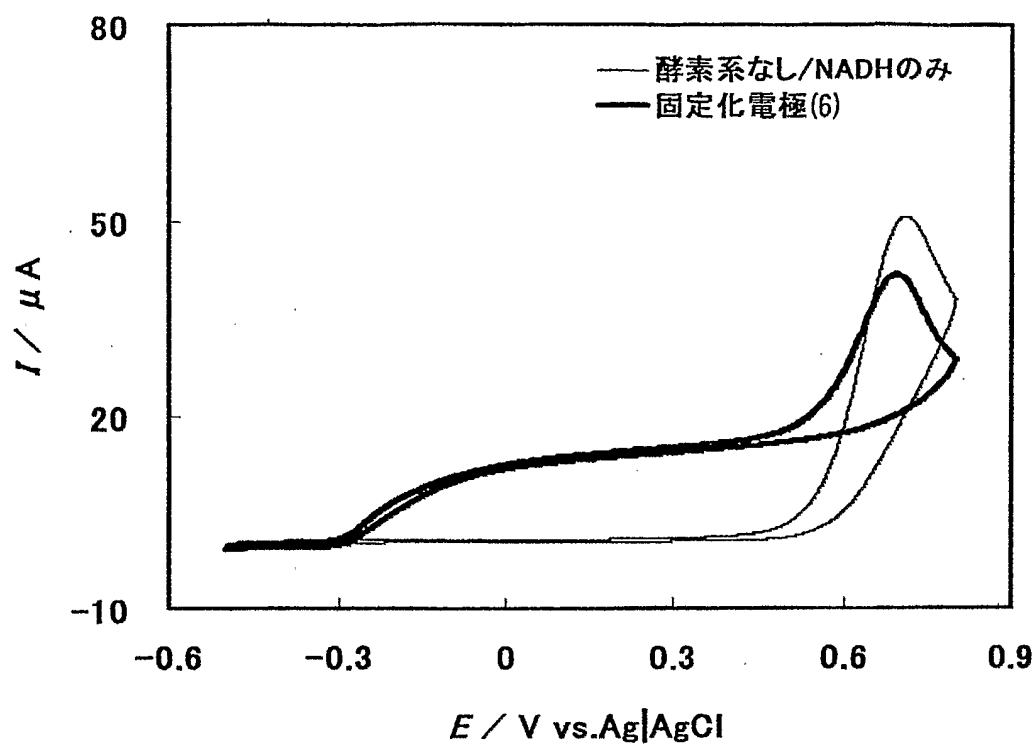
第3図



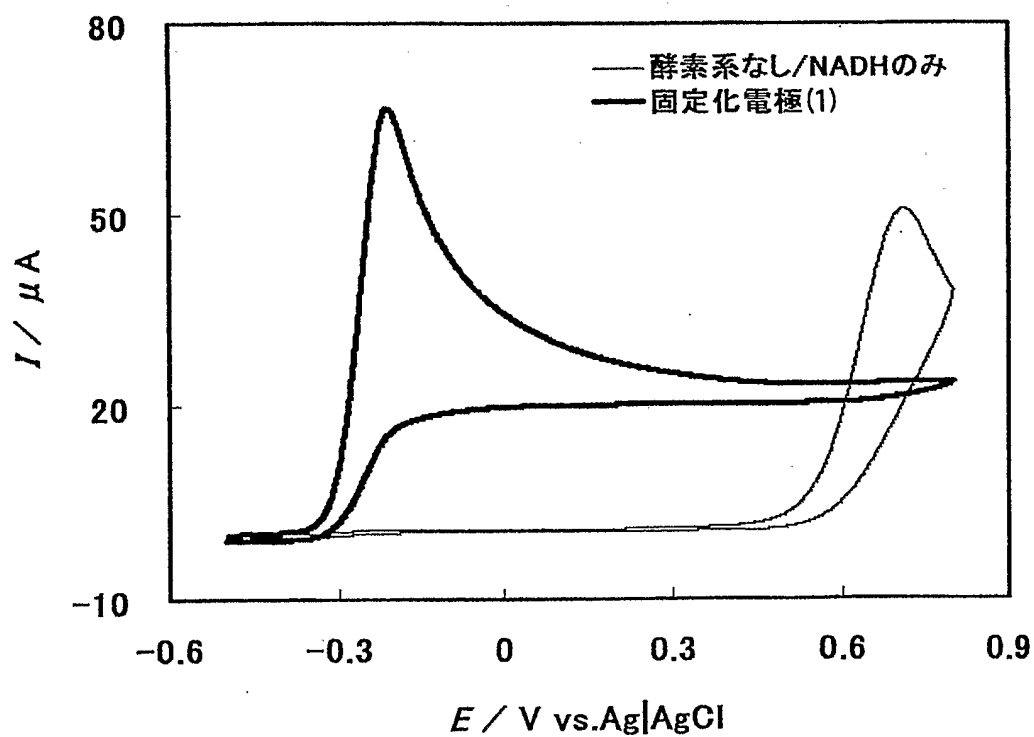
第4図



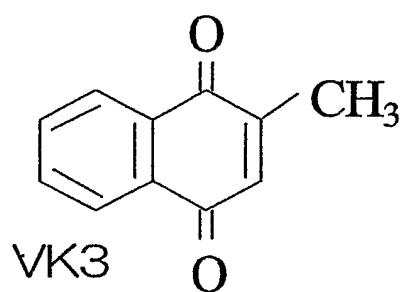
第5図A



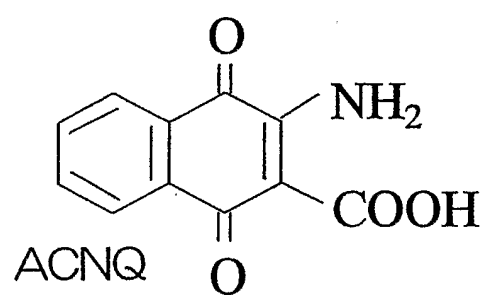
第5図B



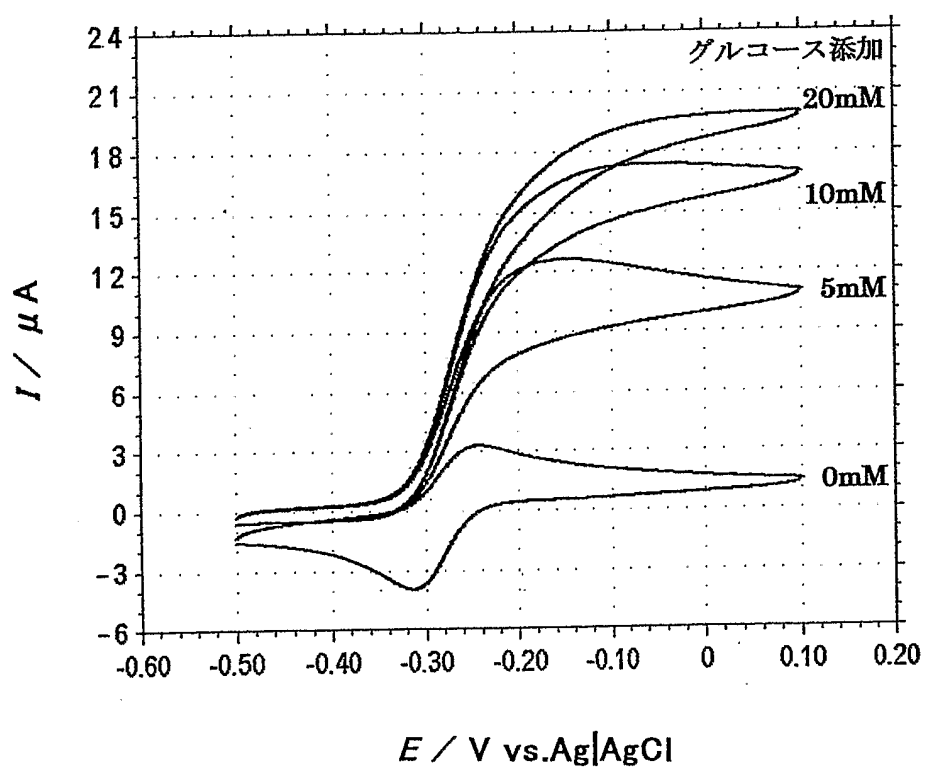
第6図A



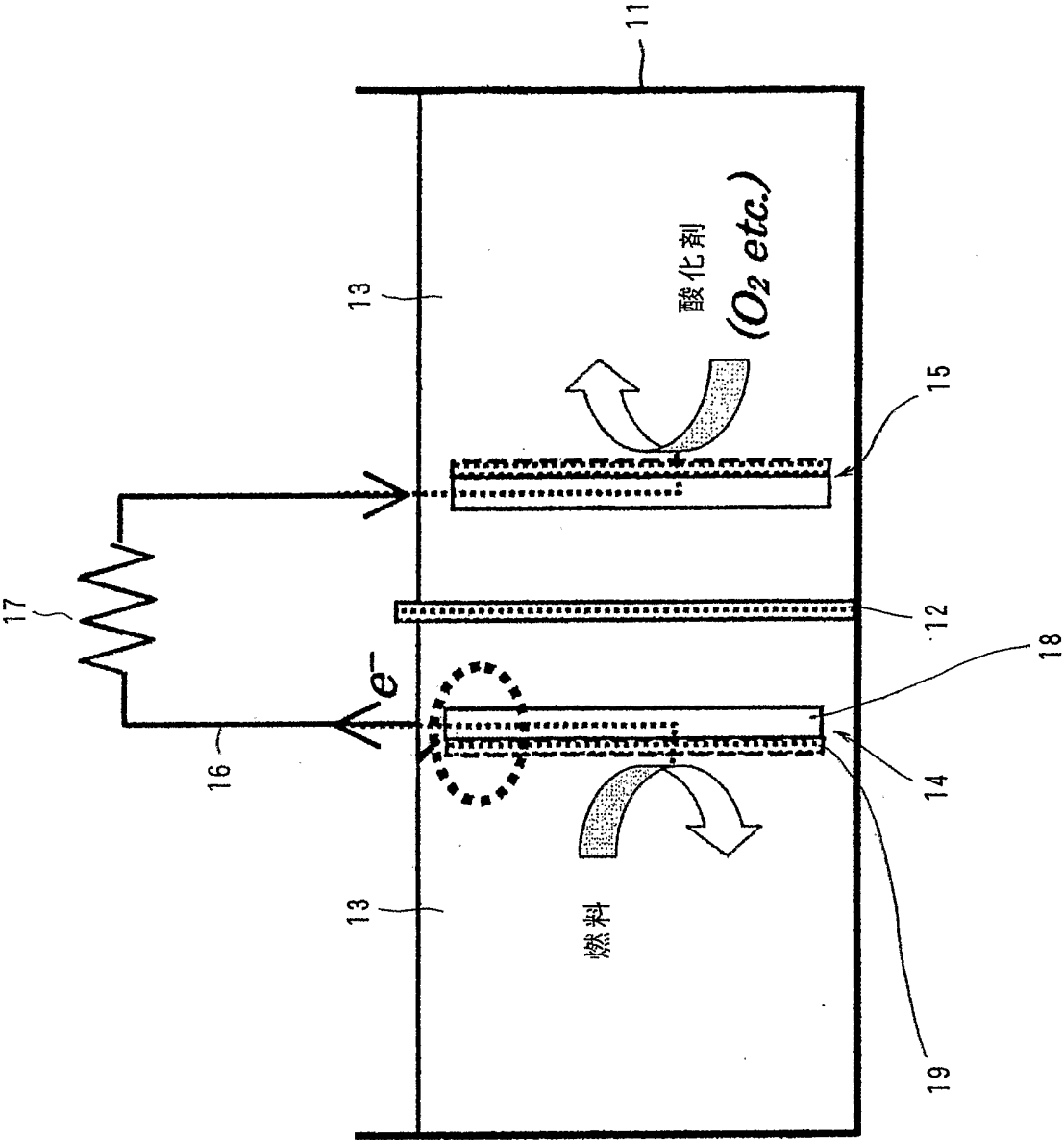
第6図B



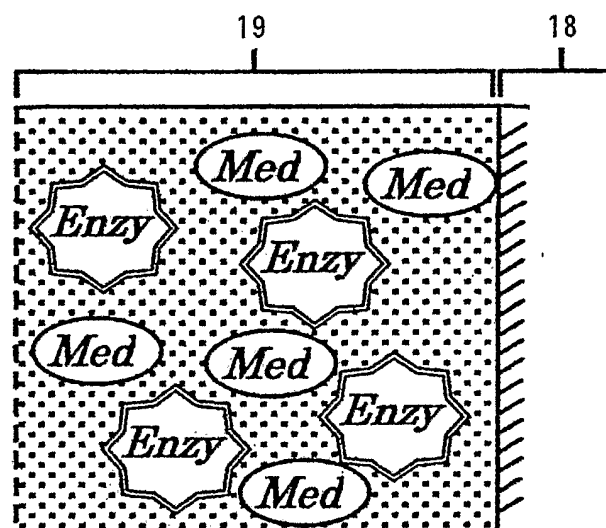
第7図



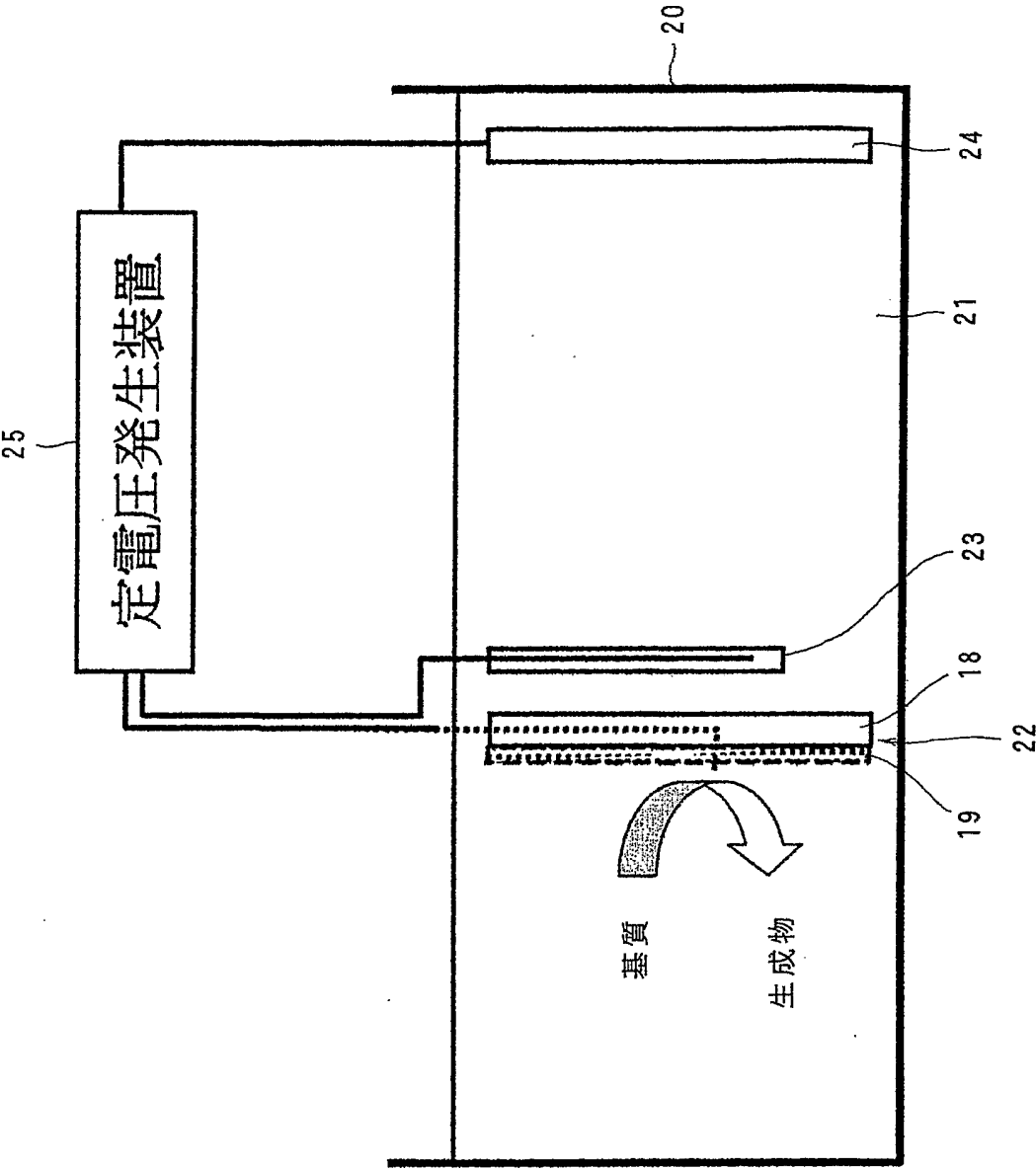
第8図



第9図



第10図



符号の説明

1 1、2 0	反応槽
1 2	仕切り
1 3	反応溶液
1 4	バイオカソード
1 5	バイオアノード
1 8	電極基板
1 9	酵素／電子受容体化合物固定化層
2 2	ワーキング電極
2 3	参照電極
2 4	対向電極

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N11/00, C12M1/40, G01N27/30, 27/48, H01M8/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N11/00, C12M1/40, G01N27/30, 27/48, H01M8/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, Web of Science, JSTPlus (JICST)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 3-280881 A (Terumo Corp.), 11 December, 1991 (11.12.91), Particularly, example 1 (Family: none)	1
X	JP 8-196274 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 06 August, 1996 (06.08.96), Particularly, examples 1, 3 (Family: none)	1
X	JP 8-296177 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 12 November, 1996 (12.11.96), Particularly, examples 1, 3 (Family: none)	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July, 2004 (29.07.04)

Date of mailing of the international search report

17 August, 2004 (17.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007335

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUYE S. et al., "Immobilization of glucose oxidase on poly-(L-lysine)-modified polycarbonate membrane.", BIOTECHNOL.APPL.BIOCHEM., 1998, 27(3), pages 245 to 248	1
X	MIZUTANI F. et al., "Rapid measurement of transaminase activities using an amperometric L-glutamate-sensing electrode based on a glutamate oxidase-polyion complex-bilayer membrane.", SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 1998, 52(1-2), pages 23 to 29	1
A	SATO A. et al., "Thermal stability and electron transfer reaction of modified myoglobin immobilized on a carbon electrode in poly (ethylene oxide) oligomers.", ELECTROCHIMICA ACTA, 2001, 46(10-11), pages 1729 to 1735	1
P,X	SATO A., et al., "Diaphorase/naphthoquinone derivative-modified electrode as an anode for diffusion-controlled oxidation of NADH in electrochemical cells.", CHEMISTRY LETTERS, 2003 October, 32(10), pages 880 to 881	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007335

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim No.: 1.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007335

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

<With respect to unity of invention>

It appears that the matter common to claims 1-28 is an immobilization support comprising a compound having a functional group and a compound having two or more groups capable of polymerization reaction with the functional group having compound and matter relevant thereto.

However, search has revealed that this common matter is not novel because an immobilization support comprising glutaraldehyde and poly-L-lysine is described in the following references 1-5.

That is, this common matter falls within the category of prior art and hence is not a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

Therefore, there is no matter common to all the claims. Since there exists no other common feature which can be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 can be found among the different inventions.

Therefore, it is apparent that the claims 1-28 do not satisfy the requirement of unity of invention.

From the viewpoint that the references 4-5 describe an enzyme immobilization support obtained by immersing a membrane modified with poly-L-lysine in an aqueous solution of glutaraldehyde and describe a method of immobilizing an enzyme on the support so as to use the same as an electrode, the immersion inducing a high possibility of at least portion of poly-L-lysine being crosslinked by glutaraldehyde; from the viewpoint that the reference 6 describes a method of immobilizing an enzyme on an electrode with the use of a polyion complex consisting of poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid, the poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid being highly probably crosslinked with each other through an ionic bond; and from the viewpoint that the technology described in these references cannot be special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, the claims of this application involve 22 inventions as follows:

1. invention of claim 1,
2. invention of claims 2-3,
3. invention of claim 4,
4. invention of claim 5,
5. invention of claim 6,
6. invention of claim 7,
7. invention of claim 8,
8. invention of claim 9,
9. invention of claim 10,
10. invention of claim 11,
11. invention of claim 12,
12. invention of claim 13,
13. invention of claim 14,
14. invention of claim 15,
15. invention of claim 16,
16. invention of claim 17,
17. invention of claim 18,
18. invention of claims 19-20, 23-24 and 27-28,
19. invention of claim 21,
20. invention of claim 22,
21. invention of claim 25, and
22. invention of claim 26.

(continued to further extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007335

(continuation from previous extra sheet)

Reference 1: JP 3-280881 A

Reference 2: JP 8-196274 A

Reference 3: JP 8-296177 A

Reference 4: Biotechnol.Appl.Biochem., 1998, 27, pages 245 to 248

Reference 5: Sensors and Actuators B, 1998, 52, pages 23 to 29

Reference 6: Electrochimica Acta, 2001, 46, pages 1729 to 1735

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N11/00, C12M1/40, G01N27/30, 27/48, H01M 8/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N11/00, C12M1/40, G01N27/30, 27/48, H01M 8/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, Web of Science, JSTPlus(JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 3-280881 A(テルモ株式会社)1991. 12. 11 特に, 実施例1参照(ファミリーなし)	1
X	JP 8-196274 A(日本合成ゴム株式会社)1996. 08. 06 特に, 実施例1, 3参照(ファミリーなし)	1
X	JP 8-296177 A(日本合成ゴム株式会社)1996. 11. 12 特に, 実施例1, 3参照(ファミリーなし)	1

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 07. 2004

国際調査報告の発送日

17. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SUYE S. et al., Immobilization of glucose oxidase on poly-(L-lysine)-modified polycarbonate membrane. BIOTECHNOL. APPL. BIOCHEM., 1998, 27 (3), p. 245-248	1
X	MIZUTANI F. et al., Rapid measurement of transaminase activities using an amperometric L-glutamate-sensing electrode based on a glutamate oxidase-polyion complex-bilayer membrane. SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 1998, 52 (1-2), p. 23-29	1
A	SATO A. et al., Thermal stability and electron transfer reaction of modified myoglobin immobilized on a carbon electrode in poly(ethylene oxide) oligomers. ELECTROCHIMICA ACTA, 2001, 46 (10-11), p. 1729-1735	1
PX	SATO A. et al., Diaphorase/naphthoquinone derivative-modified electrode as an anode for diffusion-controlled oxidation of NADH in electrochemical cells. CHEMISTRY LETTERS, 2003 Oct., 32 (10), p. 880-881	1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<発明の単一性について>

請求の範囲1-28に共通の事項は、ある官能基を有する化合物と重合反応することができる基を2つ以上有する化合物と、該官能基を有する化合物とを含む固定化担体およびそれに係るものであると認められる。

しかしながら、調査の結果、下記文献1-5には、グルタルアルデヒドとポリ-L-リシンとを含む固定化担体が記載されており、上記共通事項は新規でないことが明らかとなった。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-28は単一性の要件を満たしていないことは明らかである。

また、文献4-5に、ポリ-L-リシンで修飾された膜をグルタルアルデヒド水溶液に浸漬して得られる酵素固定化用担体および該担体に酵素を固定化して電極に用いる方法が記載され、該浸漬によってポリ-L-リシンの少なくとも一部はグルタルアルデヒドによって架橋される蓋然性が高いこと、文献6に、ポリ-L-リシンおよびポリ-L-グルタミン酸のポリイオンコンプレックスを用いて酵素を電極上に固定化する方法が記載され、該ポリ-L-リシンおよびポリ-L-グルタミン酸は互いにイオン結合によって架橋している蓋然性が高いこと、およびこれらの文献に記載される技術はPCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴となり得ないことを勘案するに、本願の請求の範囲には、

1. 請求の範囲1に記載の発明、
 2. 請求の範囲2-3に記載の発明、
 3. 請求の範囲4に記載の発明、
 4. 請求の範囲5に記載の発明、
 5. 請求の範囲6に記載の発明、
 6. 請求の範囲7に記載の発明、
 7. 請求の範囲8に記載の発明、
 8. 請求の範囲9に記載の発明、
 9. 請求の範囲10に記載の発明、
 10. 請求の範囲11に記載の発明、
 11. 請求の範囲12に記載の発明、
 12. 請求の範囲13に記載の発明、
 13. 請求の範囲14に記載の発明、
 14. 請求の範囲15に記載の発明、
 15. 請求の範囲16に記載の発明、
 16. 請求の範囲17に記載の発明、
 17. 請求の範囲18に記載の発明、
 18. 請求の範囲19-20, 23-24, 27-28に記載の発明、
 19. 請求の範囲21に記載の発明、
 20. 請求の範囲22に記載の発明、
 21. 請求の範囲25に記載の発明、
 22. 請求の範囲26に記載の発明
- の22発明が記載されている。

文献1: JP 3-280881 A

文献2: JP 8-196274 A

文献3: JP 8-296177 A

文献4: Biotechnol. Appl. Biochem., 1998, 27, p. 245-248

文献5: Sensors and Actuators B, 1998, 52, p. 23-29

文献6: Electrochimica Acta, 2001, 46, p. 1729-1735